

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/00, C12P 21/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 02461 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. März 1989 (23.03.89)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE88/00535 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. August 1988 (29.08.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 31 874.8 (32) Prioritätsdatum: 18. September 1987 (18.09.87) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170/178, D-1000 Berlin 65 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEIDECKER, Harald [DE/DE]; Haydnstr. 26, D-1000 Berlin 41 (DE). DAUM, Joachim [DE/DE]; Kyllmannstr. 22d, D-1000 Berlin 45 (DE). DONNER, Peter [DE/DE]; Steglitzer Damm 7a, D-1000 Berlin 41 (DE). SIEWERT, Gerhard [DE/DE]; Nibelungenstr. 39, D-1000 Berlin 28 (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PEPTIDES BY SPECIFIC CLEAVAGE OF FUSION PROTEINS WITH COLLAGENASES OBTAINED BY GENETIC ENGINEERING (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEPTIDEN DURCH SPEZIFISCHE SPALTUNG VON GENTECHNISCH GEWONNENEN FUSIONSPROTEINEN MIT COLLAGENASEN (57) Abstract Fusion proteins are disclosed having the formula $(I) H_2N-Z_1-X-(Pro-Y-Gly)_n-Pro-Z_2-COOH$, in which $n \geq 2$, X and Y are each of the 20 amino-acids determined by the genetic code, Z_1 is a bacterial amino-acid sequence and Z_2 is the target peptide composed of any desired amino-acids of the genetic code. Also disclosed are their production process and their enzymatic cleavage to form desired eukaryotic proteins. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionsproteine der Formel (I): $H_2N-Z_1-X-(Pro-Y-Gly)_n-Pro-Z_2-COOH$ in der $n \geq 2$ ist, X und Y jede der 20 durch den genetischen Code festgelegten Aminosäuren darstellt, Z_1 eine bakterielle Aminosäuresequenz und Z_2 das Zielpeptid aus beliebigen Aminosäuren des genetischen Codes bedeuten, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre enzymatische Spaltung zu gewünschten eukaryotischen Proteinen.		

Verfahren zur Herstellung von Peptiden durch spezifische Spaltung von gentechnisch gewonnenen Fusionsproteinen mit Collagenasen

Die Gentechnologie hat neue Wege zur Herstellung von Peptiden und Proteinen eröffnet, welche der herkömmlichen chemischen Synthese, insbesondere bei längeren Aminosäuresequenzen, weit überlegen sind. Dadurch stehen erstmals sonst schwer zugängliche Substanzen wie Wachstumshormon, Interferone und zahlreiche Peptidhormone in ausreichenden Mengen zur Verfügung (F.A.O. Marston, Biochem. J. 240, 1-12 [1986]).

Die gentechnischen Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden beruhen auf der Übertragung einer geeigneten Desoxyribonukleinsäure (DNA), welche Codons für die herzustellende Aminosäuresequenz enthält, auf geeignete Wirtszellen in einer Form, welche

gefolgt von den Codons für das neue Peptid sowie einem Stopcodon. Nach Überführung des Plasmid-Vektors in eine geeignete bakterielle Wirtszelle durch Transformation steuert das Hybrid-Gen die Biosynthese eines Fusionsproteins, dessen N-terminaler Teil sich von dem entsprechenden bakteriellen Protein ableitet, während der C-terminale Teil aus der Aminosäuresequenz des herzustellenden Peptids besteht. Dieses Fusionsprotein kann leicht durch Fermentation der transformierten Zellen in großen Mengen hergestellt und isoliert werden. Verschiedene bakterielle Gene sind für die Konstruktion von Hybrid-Genen eingesetzt worden, vorzugsweise jedoch solche für die Enzyme β -Galactosidase, β -Lactamase, Anthranilat-Synthetase, alkalische Phosphatase und Chloramphenicol-Acetyltransferase.

Die letzte Stufe bei der Herstellung eines Peptids nach dem oben skizzierten Verfahren ist die exakte Spaltung des Fusionsproteins. Um diese zu ermöglichen, muß das Hybrid-Gen so konstruiert werden, daß in dem späteren Fusionsprotein zwischen dem bakteriellen Teil und der neu herzustellenden Peptidsequenz eine leicht und selektiv spaltbare Peptidbindung vorhanden ist. Die Entwicklung eines spezifischen und möglichst breit anwendbaren Verfahrens für die Spaltung von Fusionsproteinen hat sich als das größte und bisher nicht völlig zufriedenstellend gelöste Problem bei der gentechnischen Herstellung kleinerer und mittelgroßer Peptide erwiesen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein spezifisches und daher allgemein anwendbares Verfahren zur Spaltung von Fu-

Chem. Hoppe-Seyler 367, Suppl. Aug. 1986, S. 162, Abstr. 19.01.03), die spezifisch nach Lysin spaltet, ist ebenfalls eingesetzt worden.

Sehr viel spezifischer und damit breiter anwendbar sind Verfahren, die eine spezifische Bindung innerhalb einer genau definierten Sequenz aus mehreren Aminosäuren spalten. So konnten P.R. Szoka et al. (DNA 5, 11-20 [1986]) ein Fusionsprotein, in dem eine Teilsequenz aus Anthranilat-Synthetase sowie Rinder-Wachstumshormon über die Sequenz Asp-Pro miteinander verknüpft sind, durch Einwirkung von Säure in die beiden Bestandteile zerlegen, weil die Bindung Asp-Pro sehr säurelabil ist. Neben der Tatsache, daß man bei der Einwirkung von Säure auch mit der Spaltung weiterer Peptidbindungen als Nebenreaktion rechnen muß, hat dieses Verfahren vor allen den Nachteil, daß das Prolin aus der Kopplungssequenz am N-terminalen Ende des Peptids übrig bleibt, was in vielen Fällen nicht tolerabel ist. Die gleiche Einschränkung muß man bei der Umsetzung mit Renin machen, welches verwendet worden ist, um in einem Fusionsprotein innerhalb der Sequenz Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr selektiv die Bindung zwischen den beiden Leucin-Resten zu spalten (J.S. Boger et al., EPA 0163573.). In diesem Fall bleiben drei zusätzliche und häufig unerwünschte N-terminale Aminosäuren übrig.

Faktor Xa, eine Plasmaprotease, deren normale Funktion die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin ist, ist von K. Nagai und H.C. Thøgersen (Nature 309, 810-812 [1984]) verwendet worden, um humanes β -Globin aus einem Fusionsprotein freizusetzen, des-

Trypsinogen, dem natürlichen Substrat der Enterokinase.

Versuche, Fusionsproteine, in denen alkalische Phosphatase und adrenocorticotropes Hormon über die genannte Sequenz verknüpft waren, mit Enterokinase zu spalten, waren jedoch nicht erfolgreich.

In EP 20290 wird ein Verfahren beschrieben, das die hohe Spezifität von Collagenasen zur Spaltung von Fusionsproteinen entsprechender Struktur ausnutzt.

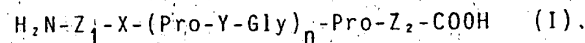
Collagenasen erkennen die Sequenz Pro-Y-Gly-Pro, wobei Y jede beliebige der 20 Aminosäuren des genetischen Codes sein kann, und spalten zwischen Y und Gly. Aus einem Fusionsprotein, welches diese Sequenz enthält, wird ein Peptid freigesetzt, welches am N-terminalen Ende noch die aus der Collagenase-Sequenz stammenden Aminosäuren Gly und Pro enthält. Diese können als Dipeptid mit einem weiteren Enzym, der Postprolin-Dipeptidyl-Aminopeptidase (PPDA), entfernt werden.

Versuche zur Spaltung von Peptiden und Proteinen, welche die Sequenz Pro-Y-Gly-Pro enthalten, mit Clostridiopeptidase A, einer Collagenase aus Clostridium histolyticum (EC 3.4.24.3), haben nun gezeigt, daß die Anwendung der oben beschriebenen Reaktionsfolge zur Herstellung von Peptiden über Fusionsproteine nur in sehr begrenztem Maße möglich ist. Zwar konnten M. Töpert et al. (Mitteilung beim 14. FEBS-Meeting [1981]) zeigen, daß sich ein relativ kleines, halbsynthetisches Modellpeptid, und zwar die Verbindung

Cbo-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Insulin-A-Kette (Rind)

ses Protein ließ sich mit Collagenasen ähnlich gut spalten wie das entsprechende Collagen selbst. Es ist jedoch nicht bekannt, an welchen Stellen innerhalb der Sequenz von ungefähr 60 Aminosäuren das Fusionsprotein genau gespalten wird. Es zeigte sich außerdem, daß ein mehr oder weniger großer Rest dieser Sequenz noch am N-terminalen Ende des C-terminalen Spaltproduktes vorhanden ist. Daher ist diese Verfahrensvariante zur Herstellung von Polypeptiden mit genau vorgegebenem N-terminalen Ende ungeeignet.

Die vorliegende Erfindung besteht in einem Verfahren zur Herstellung von Zielpeptiden, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man aus einem Fusionsprotein der Formel I,



in der

$n \geq 2$ ist,

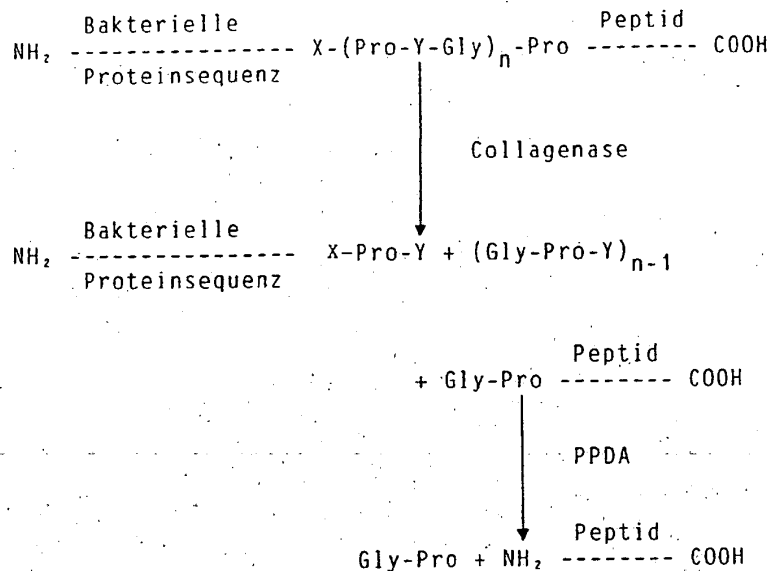
X und Y jede der 20 durch den genetischen Code

festgelegten Aminosäuren darstellt,

Z_1 eine bakterielle Aminosäuresequenz und

Z_2 das Zielpeptid aus beliebigen Aminosäuren des genetischen Codes bedeuten,

die C-terminal auf die Aminosäuresequenz $-\text{X}-(\text{Pro-Y-Gly})_n-\text{Pro}-$, in der X und Y jede genetisch kodierbare Aminosäure und $n \geq 2$ bedeuten, folgende Proteinsequenz enzymatisch mit Collagenase und Postprolin-dipeptidylaminopeptidase (PPDA) abspaltet.



Für X und Y kann jede der im genetischen Code festgelegten 20 Aminosäuren stehen. n bedeutet bevorzugt 2 bis 10.

Der Vorteil des neuen Verfahrens zur Spaltung von Fusionsproteinen besteht gegenüber dem Verfahren aus EP 20290 darin, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit z.B. mit Clostridiopeptidase A um Größenordnungen gesteigert werden kann. Fusionsproteine, die die Erkennungssequenz für Collagenase in repetitiver Form enthalten, lassen sich unvergleichlich viel besser spalten als die entsprechenden Fusionsproteine mit einer einfachen Spaltstelle für Collagenasen.

synthese der in Tab. 1 dargestellten Proteine bewirken. Dazu wurden in zwei Positionen des phoA-Gens auf pSB94, nämlich in die NcoI- bzw. in die SphI-Sequenz, Oligonukleotide eingefügt, welche in den modifizierten Genen Codons für die durch Collagenasen erkennbaren Aminosäuresequenzen bilden. Restriktionskarten von pSB94 und der davon abgeleiteten Plasmide pSA302, pSA506 und pHS4133 sind in den Abb. 1-4 dargestellt.

Die Ergebnisse der Umsetzung der 3 Modellproteine mit Clostridiopeptidase A sind auf Seite 35 und 36 sowie in Tab. 2 dargestellt. S. 35 zeigt eine gelelektrophoretische Trennung, die die Entstehung von Spaltprodukten des erwarteten Molekulargewichtes und damit die spezifische Spaltung an der vorbestimmten Stelle belegt. Auf Seite 36 ist die Abhängigkeit der Produktbildung von der Inkubationszeit und der eingesetzten Enzymmenge dargestellt. Die aus den Kurven ermittelten Produktbildungsraten, die in Tab. 2 zusammengefaßt sind, machen deutlich, in welchem Umfang eine Doppelschnittstelle (HS 4133/1) und erst recht eine fünffache-Schnittstelle (SA 506/1) die Reaktionsfähigkeit gegenüber Collagenasen im Vergleich zu einer einfachen Schnittstelle (SA 302/1) erhöhen.

In der deutschen Patentanmeldung (Aktenzeichen P 37 31 875.6), deren Gegenstand ein Verfahren zur Herstellung von adrenocorticotropem Hormon und davon abgeleiteten Peptiden ist, werden Fusionsproteine beschrieben, in denen die Hormonsequenz über eine einfache bzw. repetitive Collagenase-Schnittstellen an Teilsequenzen der alkalischen Phosphatase aus E.coli gekoppelt sind. Die dort beschrie-

ERSATZBLATT
ISA/EP

des entsprechenden Spaltproduktes aus SA 341/1 durch Bestimmung einer N-terminalen Partialsequenz bestätigt: der Edman-Abbau ergab die für die ersten sieben Aminosäuren von Gly-Pro-ACTH erwartete Sequenz. Offenbar werden durch Spalten einer ersten Bindung innerhalb einer repetitiven Sequenz die weiteren Spaltstellen durch Freilegung und bessere Zugänglichkeit so aktiviert, daß sie sehr viel rascher reagieren als die erste Spaltstelle, so daß Zwischenprodukte unvollständiger Spaltung nicht zu erfassen sind.

Durch die Verwendung repetitiver Collagenase-Schnittstellen wird die Spezifität des Verfahrens deutlich erhöht, und selbst Peptide, die zufällig die Sequenz Pro-X-Gly-Pro enthalten, könnten wegen der geringen Reaktionsfähigkeit dieser Sequenz unter den hier angewendeten Bedingungen hergestellt werden. Damit ist das Verfahren zur Herstellung praktisch jeden beliebigen Peptids geeignet, und auch in der Wahl der Wirts-/Vektor-Systeme sowie für die Verwendung anderer Collagenasen und Amino-peptidyl-Dipeptidasen ähnlicher Spezifität gibt es keinerlei Einschränkungen.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich natürlich auch in einem Schritt, d.h. bei gleichzeitiger Umsetzung mit Collagenase und PPDA, durchführen.

Am 16.07.1979 wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, Md., USA hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pBR 322 (ATCC 40015).

Am 16.07.1979 wurde bei der DSM, Göttingen hinterlegt:

Escherichia coli SB 44 (DSM 1606).

Seit dem 26.11.1973 liegt bei der DSM eine Hinterlegung vor für:

Escherichia coli K 12 Wildtyp (DSM 498).

- 17 -

Die Trennung der beiden Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Das 6454 bp-Fragment wurde aus einem 0,7 % Agarosegel durch Elektroelution isoliert [T. Maniatis, E. Fritsch, J. Sambrock; Molecular Cloning, 164-165, Cold Spring Harbor Lab. New York (1982)] und in einem Ligaseansatz über die komplementären 5'-überhängenden Einzelstrangenden zu Ringmolekülen verknüpft. Die Ligasereaktion mit T4-Ligase (Biolabs, USA) erfolgte in einem Reaktionspuffer mit 50mM TrisHCl, 10mM MgCl₂, 20mM Dithiothreitol, 50µg/ml Rinderserumalbumin, 1mM ATP, pH 7,8. Der Ligaseansatz (100µl Volumen) wurde 16 Stunden bei 13°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Phenolextraktion gestoppt und die DNS aus der wässrigen Phase nach dreimaliger Ätherextraktion mit Äthanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde der DNS-Niederschlag in 50µl DNS-Puffer (45mM TrisHCl, 0,1mM EDTA, pH 7,9) gelöst und zur Transformation kompetenter Zellen des Stammes Escherichia coli SB44 eingesetzt [200µl kompetente Zellen +25µl der DNS aus dem Ligaseansatz].

Die Herstellung von kompetenten Zellen sowie Transformationsbedingungen entsprechen den in EP 23882 beschriebenen Verfahren und Bedingungen.

Aus den erhaltenen Transformanten (ampicillinresistente Zellen) wurde Plasmid-DNS isoliert und durch Restriktionsanalyse die Struktur des Plasmids bestätigt.

Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines automatisierten DNS-Syntheseapparates, Modell 381A der Firma 'Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Calif. 94 404, USA', nach den Angaben des Geräteherstellers synthetisiert und durch Gelelektrophorese gereinigt.

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach dem Didesoxy-Verfahren (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 [1977]) unter Verwendung der Einzelstrang-Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 (C. Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103-119 [1985]), die bei Boehringer (Mannheim), Pharmacia-LKB GmbH und vielen anderen Anbietern erhältlich sind.

Zur radioaktiven Markierung wurde Desoxyadenosin-5- $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ thiotriphosphat eingesetzt (M.D. Biggin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965 [1983]).

Die Restriktionsendonukleasen EcoRI, PstI, SphI und HaeIII sowie DNS-Ligase (T4) wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. NcoI war von New England Biolabs GmbH, 6231 Schwalbach, und Polynukleotid-Kinase (T4) von Pharmacia/P-L, 7800 Freiburg i.Br.

quenzen enthielten, wurden durch Koloniehybridisierung identifiziert. Die Koloniehybridisierung wurde entsprechend dem von T. Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA [1982]) angegebenen Basisprotokolle in einer von J.P. Gergen et al. (Nucleic Acids Research 7, 2115-2136 [1979]) beschriebenen Variante durchgeführt. Als radioaktives Hybridisierungsreagenz dienten die o.g. Oligonukleotide, die durch Umsetzung mit γ - P^{32} -ATP und Polynukleotidkinase (T4) zuvor mit 5'- P^{32} -Phosphat markiert worden waren.

In den neukombinierten Plasmiden der positiven Klone wurde die Orientierung des synthetischen NcoI-Fragmentes von 18 Bp durch Restriktionsanalyse ermittelt. Dazu wurde nach Standardverfahren Plasmid-DNS isoliert und mit der Restriktionsendonuklease HaeIII umgesetzt. Die entstandenen Fragmentmischungen wurden durch Gelelektrophorese analysiert (Molekulargewichtsbestimmung durch Vergleich mit HaeIII-geschnittenem pBR322 in einem 8 %igen Polyacrylamidgel).

Die für die Integration des synthetischen Fragmentes von 18 Bp verwendete NcoI-Schnittstelle ist in pSB94 auf einem HaeIII-Fragment von 385 Bp lokalisiert. Dieses Fragment muß in den neukombinierten Plasmiden fehlen und durch zwei neue Fragmente ersetzt sein, da das 18 Bp-Fragment selbst eine HaeIII-Sequenz trägt. Die Größe der beiden neuen Fragmente hängt von der Orientierung des 18 Bp-Fragmentes ab: in der gewünschten, in Abb. 2 dargestellten Orientierung werden Fragmente von 342 Bp und 61 Bp erwartet, während die entgegengesetzte Orientierung Fragmente

Die so erhaltenen neukombinierten Plasmide haben nur auf einer Seite des aus den beiden 45mer-Oligonukleotiden gebildeten DNS-Abschnittes eine intakte SphI-Sequenz. Diese hat in den gesuchten Plasmiden einen Abstand von 257 Bp von der nächstgelegenen EcoRI-Sequenz (vergl. Abb. 3), während diese Distanz in den Plasmiden der entgegengesetzten Orientierung genau wie in pSB94 nur 212 Bp beträgt.

Die Größenbestimmung der DNS-Fragmente, die durch Umsetzung der neukombinierten Plasmide mit den Restriktionssequenzen EcoRI und SphI erhalten wurden, durch Gelelektrophorese zeigte, daß pSA506 eines der Plasmide mit der gewünschten Orientierung des synthetischen DNS-Fragmentes ist. Zur Bestätigung der in Abb. 3 dargestellten Sequenz wurde das EcoRI/SphI-Fragment von 257 Bp in den Sequenziervektor M13mpl8 kloniert und sequenziert.

1.3. Herstellung von pHS4133

Eine Reaktionsmischung aus 3 µg DNS des Plasmids pSA506 und 5 Einheiten des Restriktionsenzym PstI in 50 µl Reaktionspuffer (wie in 1.1.) wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und wie in Beispiel 1.1. aufgearbeitet. Es entstanden 3 DNS-Fragmente (27 Bp, 2420 Bp und 4007 Bp), die durch Elektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel voneinander getrennt wurden. Die beiden größeren Fragmente wurden durch Elektroelution aus dem Gel isoliert, vereinigt und mit DNS-Ligase (T4) unter Reaktionsbedingungen wie in Beispiel 1.1. umgesetzt, aufgearbeitet und zur Transformation

(vergl. D.M. Weir, Handbook of Experimental Immunology, Vol. III, Blackwell Scientific Publ, Oxford 1978) hergestellt worden. Die zur Immunisierung eingesetzte Phosphatase wurde nach bekannten Verfahren (A. Torriani, in: 'Methods in Enzymology', Vol. XIIB, 212-218, L. Grossman, K. Moldave (Eds.) Academic Press, New York [1968]) isoliert. Als zweiter Antikörper diente ein Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen-IgG, an welches alkalische Phosphatase als Marker-Enzym gekoppelt war (Cooper Biomedical Inc., Malvern, USA). 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat wurde als Farbreagenz verwendet.

Die drei Proteine sowie auch die drei o.g. Stämme, von denen sie produziert werden, sind untereinander so ähnlich, daß für alle das gleiche Fermentations- und Isolierungsverfahren angewendet werden kann.

2.1. Fermentation

20 ml L-Medium (E.S. Lennox, Virology 1, 190-206 [1955]), die zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin enthielten, wurden mit einer Einzelkolonie beimpft, 24 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend in 800 ml des gleichen Mediums überführt, die wiederum 16 h bei 37 °C geschüttelt wurden. Diese Vorzucht wurde in einem 20 l-Glasfermenter überführt, in dem sich 9,2 l Niedrigphosphatmedium befanden (LP-Medium nach K. Kreuzer et al., Genetics 81, 459-468 [1975]). Der Fermenter wurde 6 h bei 37 °C und einer Belüftung von 10 l/min mit 220 min⁻¹ gerührt. Anschließend wurden die Zellen in einer Durchflußzentrifuge geerntet, wobei ca. 30 g feuchte Zellmasse erhalten wurde.

- a) Die stärkste Bande des Proteingemisches hat ein Molekulargewicht, welches der in Tab. 1 angegebenen Aminosäuresequenz entspricht.
- b) Dieses Protein ist durch Phosphat reprimierbar, d.h. die Bande fehlt, wenn die Zellen wie in 2.1., jedoch mit der 10-fachen Phosphatkonzentration fermentiert wurden.
- c) Die Bande ist plasmidspezifisch, sie fehlt in Zellen des plasmidfreien Stammes E.coli SB 44, der unter den gleichen Bedingungen wie in 2.1. hergestellt wurde.
- d) Die Bande reagiert im Immunblot spezifisch mit Antiserum gegen gereinigte alkalische Phosphatase aus E.coli K12.

Aus gelelektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe eines Standardproteingemisches (Low Molecular Weight Proteins der Firma Pharmacia) ist zu erkennen, daß die Phosphatase-Derivate in der sogen. Prä-Form vorliegen, d.h. noch die Signalsequenz der alkalischen Phosphatase enthalten. Die Proteine sind in verdünntem Puffer relativ schwer löslich. Daher lassen sich in den nach Zellaufschluß und Zentrifugation erhaltenen Überständen nur geringe Mengen nachweisen.

2.4. Reinigung der Phosphatase-Derivate

Die in 2.2. erhaltenen Proteinextrakte wurden zur weiteren Reinigung der modifizierten Phosphatasen durch Gradientenchromatographie mit Hilfe eines Mitteldruck-Chromatographiegerätes (FPLC) der Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden, aufgetrennt. Eine Anionenaustauschersäule des gleichen Herstellers (Typ Mono Q-HR 5/5)

3. Spezifische Spaltung der modifizierten Phosphatase-Proteine mit Kollagenase

3.1. Reinigung der Kollagenase

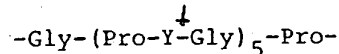
Clostridiopeptidase A aus *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.24.3) wurde von der Fa. Sigma Chemie GmbH, D-8024 Deisenhofen, Gröndwalder Weg 30, bezogen (Typ VII, Best.-Nr. C0773). Das Enzym wurde durch Gradientenchromatographie unter Verwendung des FPLC-Gerätes und der gleichen Anionenaustauschersäule wie in Beispiel 2.4. weiter gereinigt. Es wurden 2 mg Kollagenase eingesetzt und mit einem aus Puffer A (10 Tris HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8.0) und Puffer B (10 mM Tris HCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM NaCl, pH 8.0) gebildeten Gradienten von 0-200 mM NaCl mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0.5 ml/min eluiert. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 20 ml. Die Kollagenase-Aktivität wurde mit einem von E. Wünsch et al. (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 333, 149-151 [1963]) beschriebenen Test ermittelt. Die aktivste Fraktion hatte einen Proteingehalt von 0.8 mg/ml und eine spezifische Aktivität von 2500 Einheiten/mg. Die im Folgenden beschriebenen Spaltversuche wurden mit dieser Fraktion ausgeführt, die bei -20 °C aufbewahrt wurde.

bahnen in Streifen geschnitten und mit einem Gel-Scanner (Fa. Isco, optische Einheit Typ 6, Absorptionsmonitor UA-5) bei 280 nm quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe einer entsprechenden Eichkurve, die mit einem gereinigten Phosphatase-Protein erhalten worden war, wurden die Proteingehalte für die Banden des größten Spaltproduktes aus den Peakhöhen ermittelt. Die Ergebnisse sind auf S. 36 zusammengefaßt. Aus den Daten ergibt sich eine Produktbildungsrate von 21.0 pMol/min/Enzymeinheit für HS 4133/1.

Die Trennung auf S. 35 zeigt in Spur 7 eine gelelektrophoretische Trennung des größten Spaltproduktes aus einer Probe von HS 4133/1 nach vollständiger Umsetzung mit Clostridiopeptidase A.

3.3. Spaltung von SA 506/1

Das einkettige Protein hat eine Länge von 486 Aminosäuren (MG. 50 596) und enthält die durch Kollagenase spaltbare Sequenz



wobei für Y einmal His und viermal Ala steht (vergl. Tab. 1).

Bei Spaltung aller Y-Gly-Bindungen entstehen die gleichen Proteine wie aus HS 4133/1 (vergl. 3.2.) und 4 Mol Gly-Pro-Ala je Mol Substrat. Die Bestimmung der Reaktionsfähigkeit von SA 506/1 gegenüber Clostridiopeptidase A erfolgte in der gleichen Weise wie bei HS 4133/1.

Der Reaktionsansatz enthielt 53 µg S. 506/1 in 100 µl und hatte die gleichen Enzym- und Pufferkonzentrationen wie der Ansatz für

ERSATZBLATT
ISA/EP

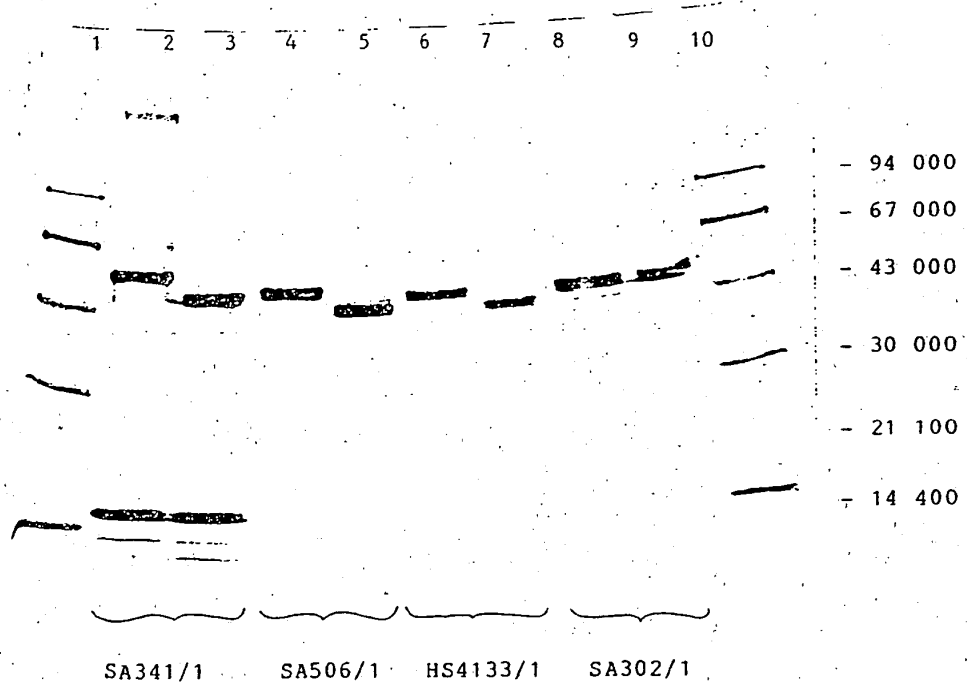
Tab. 1: Aminosäure-Sequenzen der von alkalischer Phosphatase (AP) abgeleiteten Modell- und Fusionsproteine

Protein- bezeichnung		
SA506/1	Phos (1-444)-Gly-Pro-His-Gly-(Pro-Ala-Gly) ₄ -Pro-His-Phos (448-471)	(486 AS)
HS4133/1	Phos (1-444)-Gly-Pro-His-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-His-Phos (448-471)	(477 AS)
SA302/1	Phos (1-297)-His-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-His-Gly-Phos (300-471)	(477 AS)

SA341/1	Phos (1-444)-Gly-Pro-His-Gly-(Pro-Ala-Gly) ₄ -Pro-ACTH (1-39)	(500 AS)

Die Phosphatasesequenzen auf beiden Seiten der Collagenase-Schnittstellen sind durch die Abkürzung 'Phos' sowie die in Klammern gesetzten Positionsnummern der ersten und letzten Aminosäure der jeweiligen Teilsequenz gekennzeichnet, wobei sich die Nummerierung auf die native Prä-Phosphatase (471 Aminosäuren) aus E.coli K12 bezieht. Die Sequenz für ACTH (1-39) ist in der deutschen Patentanmeldung (Aktenzeichen P 37 31 875.6) dargestellt.

Abb. 5: Gelelektrophoretische Trennung der Phosphatase-Proteine aus Tabelle 1 sowie der daraus durch Umsetzung mit Clostridiopeptidase A erhaltenen Reaktionsprodukte



Reihe 1 und 10 : Molekulargewichtsmarke

Reihe 2, 4, 6 und 8: Proteine aus Tabelle 1

Reihe 3, 5, 7 und 9: Produkte nach Spaltung mit Clostridiopeptidase A

Das in Reihe 2 und 3 eingesetzte Fusionsprotein war nicht durch Gradientenchromatographie gereinigt worden.

Die Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht in Reihe 3 ist Gly-Pro-ACTH (1-39).

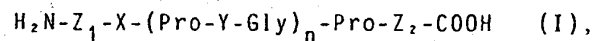
In Reihe 5 und 7 ist nur das hochmolekulare Spaltprodukt zu erkennen, das niedermolekulare Produkt hat das Gel vollständig durchlaufen.

In Reihe 9 sind außer den Produkten der Spaltung mit Clostridiopeptidase A (ME 31 200 und 10 700) auch Produkte unspezifischer Spaltung enthalten.

ERSATZBLATT
ISA/EP

Patentansprüche

1. Fusionsprotein der allgemeinen Formel I



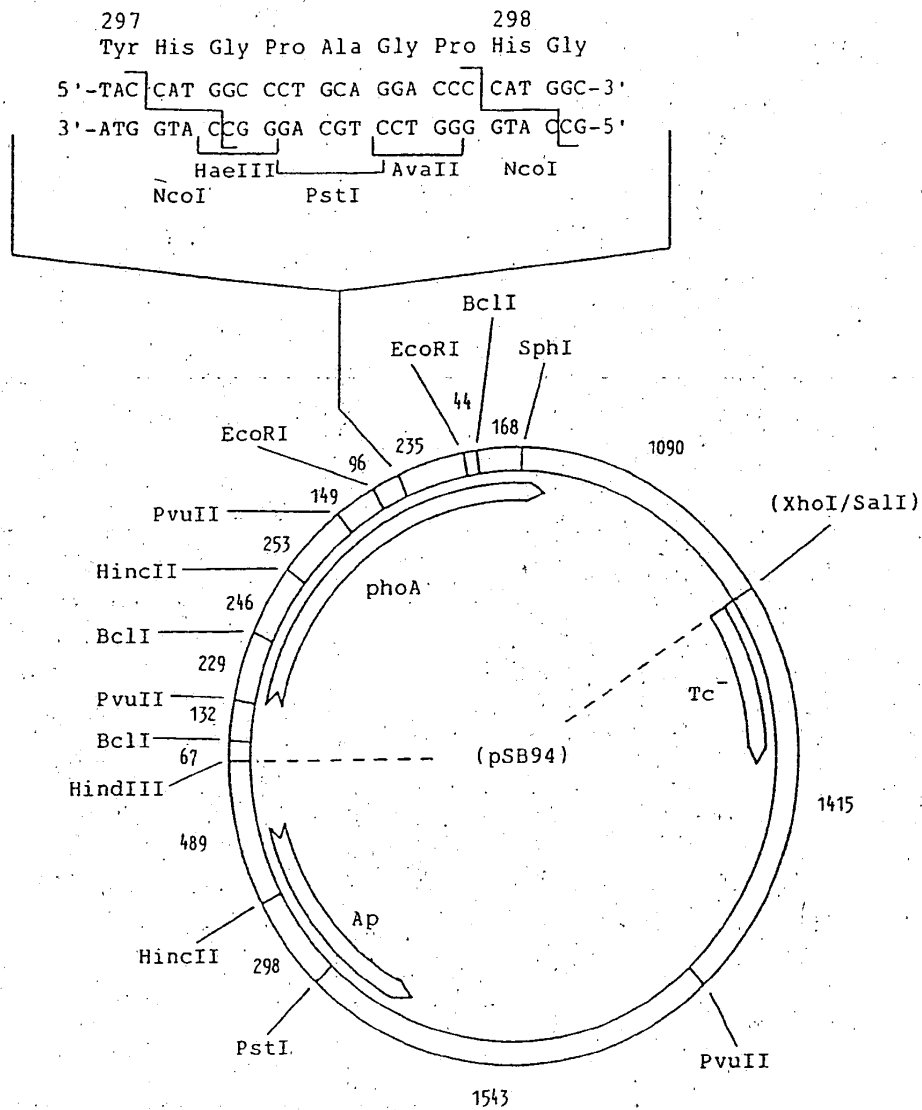
in der

 $n \geq 2$ ist, X und Y jede der 20 durch den genetischen Code festgelegten Aminosäuren darstellt, Z_1 eine bakterielle Aminosäuresequenz und Z_2 das Zielpeptid aus beliebigen Aminosäuren des genetischen Codes bedeuten.2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß n 2 bis 10 ist und X für Gly steht.3. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Z_1 eine Sequenz von 444 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuresequenz 1 - 444 der Präphosphatase aus E.coli K 12 darstellt.ERSATZBLATT
ISA/EP

12. Verfahren zur Herstellung eines eukaryotischen Proteins nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Y-Gly-Bindungen in der Aminosäuresequenz $-X-(\text{Pro-Y-Gly})_n\text{-Pro}$ mit einer Collagenase selektiv spaltet und anschließend den N-terminalen Gly-Pro-Rest mit einer Postprolindipeptidyl-aminopeptidase abspaltet.

ERSATZBLATT
ISA/EP

Abb. 2: Restriktionskarte des Plasmids pSA302



ERSATZBLATT
ISA/EP

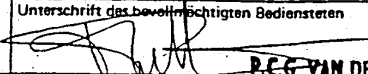
DISCUSSION WITH DONALD A. J.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	EP, A, 0 095 361 (ELI LILLY AND COMPANY) 30 November 1983 see claims 9-11 ---	1
A	EP, A, 0 161 937 (CELLTECH LIMITED) 21 November 1985 see claims 1-4 ---	1
A	EP, A, 0 157 235 (BAYER AG) 9 October 1985 see figure 1 and claims 6-8 -----	1

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (January 1985)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE88/00535

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int. Cl. ⁴ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. ⁴ IPC ⁴	C 12 N; C 12 P	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art [*]	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch.Nr. ¹³
A	EP, A 0 020 290 (SCHERING AKTIENGESellschaft) 10. Dezember 1980 Siehe Zusammenfassung, Ansprüche	1
A	Chemical Abstracts, Band 96, 1982, Nr. 3, 18. Januar 1982, (Columbus, Ohio, US), siehe Seite 176, abstract 16781y, E. Wuensch et al.: "Studies on enzymic methods for processing hybrid proteins produced by recombinant DNA technology". Siehe Zusammenfassung	1
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 81, Seiten 4692-4696, August 1984, J. Germino et al.: "Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site- specific proteolysis". Siehe Zusammenfassung und figur 2	1
<p>[*] Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
16. November 1988	09 DEC 1988	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 P.C.G. VAN DER PUTTEN	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

PCT/DE88/00535
SA 24024

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0020290	10-12-80	DE-A- 2922496	04-12-80
		JP-A-56068399	09-06-81
		AT-E- 8411	15-07-84
		US-A- 4543329	24-09-85
		DE-A- 3012170	01-10-81
		JP-A-60256396	18-12-85
		DE-A- 3012169	01-10-81
EP-A- 0095361	30-11-83	GB-A- 2121054	14-12-83
		JP-A-58219199	20-12-83
		AU-A- 560965	30-04-87
		CA-A- 1231068	05-01-88
		US-A- 4745069	17-05-88
EP-A- 0161937	21-11-85	GB-A- 2160206	18-12-85
		JP-A-61135591	23-06-86
EP-A- 0157235	09-10-85	DE-A- 3410437	26-09-85
		JP-A-60214897	28-10-85
		CA-A- 1230840	29-12-87

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82